

УДК 577.352

# Модификаторы дипольного потенциала липидных бислоев

С. С. Ефимова\*, О. С. Остроумова

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

\*E-mail: ssefimova@mail.ru

Поступила в редакцию 29.04.2015

**РЕФЕРАТ** Работа посвящена оценке величин изменения дипольного потенциала ( $\Phi_d$ ) мембран при адсорбции потенциальных модификаторов на липидных бислоях различного состава. С целью выявления диполь-модифицирующих свойств проверены флавоноиды, миорелаксанты, тиреоидные гормоны, ксантеновые и стирилпиридиновые красители. Количественное описание модифицирующего действия флавоноидов, миорелаксантов, тиреоидных гормонов и ксантеновых красителей представлено в виде отношения максимального изменения дипольного потенциала бислоя при насыщении к абсолютному значению  $\Phi_d$  немодифицированной мембраны. Определены коэффициенты наклона линейных зависимостей увеличения дипольного потенциала фосфолипидных бислоев от концентрации стирилпиридиновых красителей в мембраноомывающих растворах. Охарактеризованы зависимости величины изменения  $\Phi_d$  от химической структуры модификаторов, а также от заряда и спонтанной кривизны липидных монослоев.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** дипольные модификаторы, дипольный потенциал мембраны, ксантеновые и стирилпиридиновые красители, миорелаксанты, плоские липидные бислои, спонтанная кривизна, тиреоидные гормоны, флавоноиды.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ДФФХ – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДОФС – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин; ДОФЭ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин.

## ВВЕДЕНИЕ

Одна из актуальных задач современной молекулярной фармакологии – поиск веществ, способных влиять на величину дипольного потенциала мембраны ( $\Phi_d$ ), а следовательно, регулировать процессы транспорта через плазматическую мембрану как в норме, так и при патологии. Этот скачок потенциала на границе раздела фаз бислоем–раствор возникает в результате определенной взаимной ориентации диполей мембранных липидов и адсорбированной на поверхности бислоя воды [1–4]. Дипольный потенциал мембраны зависит от ее липидного состава. Существенную роль играют степень ненасыщенности, длина и число углеводородных цепей в молекуле фосфолипидов [5–7]. Чаще всего дипольными модификаторами являются амфифильные вещества, молекулы которых имеют значительный дипольный момент и характеризуются специфической ориентацией на границе раздела фаз. Опубликованы сведения об успешном использовании дипольных модификаторов в качестве инструментов для изучения молекулярных механизмов формирования и функционирования ионных каналов, образованных различными токсинами и антимикробными агентами

[8–25]. Установлено, что дипольмодифицирующие свойства проявляют некоторые флавоноиды, стероиды, тиреоидные гормоны, ксантеновые и стирилпиридиновые красители [1–3, 26–30].

Флавоноиды являются наиболее распространенными фенольными соединениями растительного происхождения. Это производные бензо-гамма-пирона, в основе структуры которых лежит скелет из двух бензольных колец (А и В), соединенных между собой трехуглеродным фрагментом (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>). Классификация флавоноидов основана на степени окисленности пирана (2-фенилхромана, или кольца С). Выделяют следующие группы: халконы, флавоны, флавонолы, флаваноны, флаванололы, изофлавоноиды и др. До недавнего времени считалось, что на величину дипольного потенциала мембран способны влиять только халконы, флоретин и его гликозид флорицин [1, 3, 31].

Миорелаксанты используют для снижения тонуса скелетной мускулатуры, в том числе для полного обездвиживания. Аммониевые стероиды (векуроний, панкуроний и рокуроний) относятся к недеполяризующим релаксантам. В основе структуры миорелаксантов находится стероидное ядро. Опубликованы

сведения о влиянии на  $\varphi_d$  некоторых стероидов. Так, показано [32], что введение в мембранообразующий раствор димиристоилфосфохолина холестерина, 6-кетохолестанола или копрастанола приводит к увеличению дипольного потенциала мембраны. Экстракция из липидного бислоя 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ -ола приводит к увеличению мембранной проводимости, индуцированной  $K^+$ -нонактином [20]. Этот результат указывает на то, что 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ -ол увеличивает дипольный потенциал бислоя. Установлено [33], что стероидный гормон прегненолон уменьшает величину дипольного потенциала липосом, сформированных из смеси дипальмитоилфосфатидилхолина и холестерина.

Тиреоидные гормоны, тироксин и трийодтиронин, играют ключевую роль в регуляции метаболизма. Они представляют собой йодированные производные тирозина и отличаются друг от друга числом атомов йода и их локализацией. Показано также, что йодсодержащие гормоны щитовидной железы, как и флавоноид флоретин, уменьшают дипольный потенциал холестеринсодержащих липидных бислоев [27].

Ксантеновые красители представлены двумя группами: флуоресцеины и родамины. Первую группу образуют сам флуоресцеин и его галогенопроизводные (эритрозин, эозин, бенгальский розовый и флоксин В). Ксантеновые красители группы родамина представляют вторую группу, они являются производными флуоресцеина, в которых обе гидроксильные группы заменены алкилированными аминогруппами. Показано, что адсорбция бенгальского розового на поверхности дифитаноилфосфатидилхолиновой мембраны приводит, как и действие флоретина, к уменьшению ее дипольного потенциала [29].

Стирилпиридиновые красители серии ANEPPS и RH относятся к потенциал-чувствительным флуорохромам на основе стирилгемицианинов. Они различаются длиной углеводородных хвостов и(или) полиенового фрагмента. Эти флуоресцентные красители имеют высокий дипольный момент, образованный делокализованным положительным зарядом в пиридиновом комплексе и отрицательным зарядом сульфогруппы на другом конце молекулы. RH-красители увеличивают  $\varphi_d$  фосфохолиновых мембран, и эта способность падает в ряду RH 421, RH 237 и RH 160 [28].

Цель представленной работы состояла в установлении и количественном определении влияния некоторых флавоноидов, миорелаксантов, тиреоидных гормонов и флуоресцентных красителей на дипольный потенциал липидных бислоев различного состава. Особое внимание уделено взаимосвязи между химической структурой модификаторов и выраженностью дипольмодифицирующих свойств соединений.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы

В работе использовали следующие реактивы: KCl, HEPES, пентан, этанол, хлороформ, диметилсульфоксид (DMCO), гексадекан и сквален (Sigma, США); флоретин, флоризин, рутин, генистин, генистеин, кверцетин, мирицетин, биоханин А, ( $\pm$ ) гидрат катехина, ( $\pm$ ) гидрат таксифолина, даидзеин, 2',4',6'-моногидрат тригидроксиацетофенона (ТГАФ), 2'-гидрокси-4',6'-диметооксиацетофенон (ДГАФ), RH 421, di-8-ANEPPS, L-тироксин, 3,3',5'-трийодо-L-тиронин, бенгальский розовый, флоксин В, эритрозин, эозин Y, флуоресцеин, родамин 6G, родамин 101, бромиды панкурония, векурония и рокурония (Sigma, США); RH 160 и RH 237 (Molecular Probes, США); 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДФФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДОФС), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин (ДОФЭ) (Avanti Polar Lipids, США). Химические структуры использованных модификаторов представлены в табл. 1.

### Измерение изменения величины дипольного потенциала липидных бислоев

Бислойные липидные мембраны формировали по методу Монтала и Мюллера [34] путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстия в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис*- и *транс*-) отделения. Объем каждого отделения составлял 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки – 10 мкм, диаметр отверстия – около 50 мкм. Перед началом процесса формирования мембраны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали гексадеканом. Монослои формировали на границе вода–воздух из раствора 1 или 2 мг/мл липида в пентане. Для образования монослоев использовали ДФФХ, ДОФХ, ДОФС и ДОФЭ, а также эквимольную смесь ДОФС и ДОФЭ (ДОФС/ДОФЭ). Эксперименты проводили при одинаковом ионном составе водных растворов электролита в обоих отделениях камеры (0.1 М KCl), кислотность растворов (рН 7.4) поддерживали буферной смесью 5 мМ HEPES-КОН.

Ионофоры, онактин или валиномицин из спиртового (7 мг/мл) или метанолового (0.8 мг/мл) раствора соответственно добавляли к водной фазе обоих отделений камеры до конечной концентрации  $10^{-7}$ – $10^{-5}$  М. Известно, что флоретин в фосфолипидных мембранах менее эффективен в отношении трансмембранного тока, индуцированного  $K^+$ -валиномицином, чем  $K^+$ -нонактином [1]. Аналогичные результаты получены в ходе предварительных экспериментов с други-

ми флавоноидами, а также миорелаксантами, ксантеновыми красителями и тиреоидными гормонами. По этой причине изменения дипольного потенциала мембраны при введении указанных модификаторов измеряли с использованием нонактина. Установлено, что стирилпиридиновые красители в ДФФХ-бислоях менее эффективны в отношении трансмембранного тока, индуцированного  $K^+$ -нонактином, чем  $K^+$ -валиномицином, поэтому в экспериментах по измерению увеличения дипольного потенциала мембраны, вызванного адсорбцией этих красителей, применяли валиномицин.

Модификаторы вводили в оба отделения камеры из миллимолярных растворов в этаноле, ДМСО или воде до конечной концентрации в околомембранных растворах в диапазоне от 2.5 до 150 мкМ для флавоноидов, от 1 мкМ до 1 мМ для миорелаксантов, от 0.25 до 10 мкМ для ксантеновых красителей, от 1 до 50 мкМ для тиреоидных гормонов щитовидной железы и от 1 до 10 мкМ для стирилпиридиновых красителей.

Конечная концентрация растворителя (этанол, метанол или ДМСО) в камере не превышала 0.1%. Указанные растворители в такой концентрации не нарушали целостности и стабильности липидных бислоев. В отсутствие ионофоров дипольные модификаторы в максимальных концентрациях также не влияли на проводимость модельных мембран.

Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments, США). Для подачи трансмембранного потенциала ( $V$ ) и отведения сигнала с мембраны использовали хлорсеребряные электроды (Ag/AgCl), соединенные с растворами камеры через мостики с 1.5% агарозой в растворе 2 М KCl. Измерения проводили при комнатной температуре.

Данные обрабатывали с использованием 8-полярного фильтра Бесселя (Model 9002, Frequency Devices) и частоты фильтрации 1 кГц. Записи трансмембранных токов обрабатывали с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Статистический анализ данных проводили при помощи программы Origin 8.0 (OriginLab, США).

Проводимость мембраны ( $G$ ) определяли как отношение равновесного тока, протекающего через бислоюную липидную мембрану ( $I$ ), к трансмембранному потенциалу ( $V$ ), равному 50 мВ. Изменение дипольного потенциала ( $\Delta\phi_d$ ) при введении модификаторов определяли с использованием статистики Больцмана:

$$\Delta\phi_d = \frac{kT}{e} \ln\left(\frac{G_m}{G^0}\right), \quad (1)$$

где  $G^0$  и  $G_m$  – значения равновесной  $K^+$ -проводимости бислоя, обусловленной ионофором, до и после введения модификатора;  $e$  – заряд электрона;  $k$  – постоянная Больцмана ( $1.38 \times 10^{-23}$  Дж/К),  $T$  – термодинамическая температура ( $T = 294$  К) [1].

Средние величины изменения дипольного потенциала мембран определяли как средние арифметические значения  $\Delta\phi_d$  в каждой из экспериментальных систем при измерении от трех до пяти бислоев (среднее  $\pm$  SD).

Адсорбцию флавоноидов, миорелаксантов, тиреоидных гормонов и ксантеновых красителей на поверхности липидных бислоев описывали с использованием изотермы Ленгмюра:

$$\Delta\phi_d(C) = \frac{\Delta\phi_d(\infty)C}{C + K}, \quad (2)$$

где  $\Delta\phi_d(C)$  – изменение дипольного потенциала мембран при концентрации ( $C$ ) модификатора в омывающем растворе,  $\Delta\phi_d(\infty)$  – максимальное изменение дипольного потенциала мембран при  $C \rightarrow \infty$ ,  $K$  – константа десорбции модификатора, характеризующая его сродство к липидной фазе [3, 26]. Величину  $\Delta\phi_d(\infty)$  определяли по графику зависимости  $\Delta\phi_d(C)$  как среднюю величину, соответствующую насыщению: неизменности дипольного потенциала мембран при дальнейшем увеличении концентрации модификатора. Величину  $K$  находили как тангенс угла наклона прямой, аппроксимирующей зависимость

$$\frac{\Delta\phi_d(\infty)}{\Delta\phi_d(C)} \left(\frac{1}{C}\right).$$

Погрешность  $\Delta\phi_d(\infty)$  определяли как максимальную экспериментальную погрешность при измерении  $\Delta\phi_d(C)$ , а погрешность определения параметра  $K$  рассчитывали как погрешность частного

$$\left(\frac{\Delta\phi_d(\infty)}{\Delta\phi_d(C)}\right).$$

В пределах измеряемых концентраций стирилпиридиновых красителей (до 10 мкМ) эффекта насыщения не наблюдается. Дальнейшее увеличение концентрации красителя приводит к разрушению липидного бислоя. По указанным причинам для описания адсорбции на бислое стирилпиридиновых красителей применяли выражение, являющееся результатом линеаризации уравнения (2) при малых концентрациях дипольного модификатора ( $C \ll K$ ):

$$\Delta\phi_d(C) = \beta C, \quad (3)$$

где  $\beta = \frac{\Delta\phi_d(\infty)}{K}$  –

коэффициент наклона прямой зависимости увеличения дипольного потенциала бислоев от концентрации красителя в омывающем растворе [28].

Для сравнения эффективности дипольмодифицирующего действия различных модификаторов использовали относительную величину изменения дипольного потенциала ( $\gamma$ ), которую рассчитывали как:

$$\gamma = \frac{\Delta\phi_d(\infty)}{\phi_{d_{nm}}} \cdot 100\%, \quad (4)$$

где  $\phi_{d_{nm}}$  – величина дипольного потенциала немодифицированной мембраны, определяемая по литературным данным. В отсутствие дипольных модификаторов дипольный потенциал ДФФХ-, ДОФХ-, ДОФС- и ДОФЭ-мембран считали равным  $250 \pm 40$  [5, 35, 36],  $225 \pm 20$  [5],  $240 \pm 20$  мВ [37, 38] и  $220 \pm 5$  мВ [5, 35, 36] соответственно. Для ДОФС/ДОФЭ-бислоев  $\phi_{d_{nm}}$  рассчитывали как среднее величин  $\phi_{d_{nm}}$  ДОФС- и ДОФЭ-мембран. Погрешность определения  $\gamma$  рассчитывали как погрешность частного

$$\left(\frac{\Delta\phi_d(\infty)}{\phi_{d_{nm}}}\right).$$

В случае стирилпиридиновых красителей величину  $\gamma$  определяли как отношение изменения дипольного потенциала бислоя при 5 мкМ концентрации модификатора к  $\phi_{d_{nm}}$ . Считали, что агенты, обладающие «слабыми» дипольмодифицирующими свойствами, характеризуются величиной  $\gamma$  в диапазоне от 0 до 10%, «средними» – от 10 до 30%, «сильными» – от 30 до 60%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Флавоноиды

Известно, что адсорбция флоретина на мембране в первом приближении может быть описана изотермой адсорбции Ленгмюра (1) с характеристическими параметрами: максимальное изменение дипольного потенциала при насыщении ( $\Delta\phi_d(\infty)$ ) и константа десорбции флавоноида ( $K$ ) [3, 39]. В табл. 1 представлены величины  $\gamma$  (4), характеризующие относительные изменения дипольного потенциала мембраны при введении различных модификаторов. Как видно из табл. 1, все флавоноиды уменьшают дипольный потенциал мембраны. По выраженности дипольмодифицирующих свойств проверяемые агенты можно условно разделить на три группы. К первой группе относятся модификаторы «малой» эффективности с величиной  $\gamma$  в диапазоне от 0 до 10%. Это изофлавоны даидзеин и генистин, флаванол катехин, флаванол таксифолин и синтетический флорглюцинол ТГАФ. Во вторую группу входят соединения, обладающие более выраженными дипольмодифициру-

щими свойствами, так называемой «средней» эффективностью ( $\gamma$  от 10 до 30%): флаванол рутин, изофлавоны генистеин и флорглюцинол ДГАФ. К третьей группе относятся самые «сильные» среди флавоноидов дипольные модификаторы, у которых величина  $\gamma$  варьирует от 30 до 60%. Это халконы флоретин и флорицин, флавонолы кверцетин и мирицетин, а также изофлавоны биоханин А.

Сравнивая химические структуры флавоноидов, приведенные в табл. 1, можно сделать заключение, что дипольмодифицирующие свойства модификатора связаны с наличием двойной связи в С-кольце молекулы флавоноида. В С-кольцах таксифолина или катехина отсутствует двойная связь, представленная у кверцетина, это приводит к тому, что флаванол и флаванол, имеющие изогнутую форму, практически не влияют на величину  $\phi_d$ , в то время как адсорбция плоского флавонола на мембране вызывает значительное падение ее дипольного потенциала. Анализируя табл. 1, также можно заметить, что, как правило, величина  $\gamma$  тем больше, чем меньше число гидроксильных групп в молекуле флавоноида. Так, уменьшение  $\phi_d$  при адсорбции флорицина, гликозида флоретина, меньше, чем в случае более гидрофобного агликаона флоретина. Аналогичная ситуация наблюдается и для ряда флавонолов (кверцетин/мирицетин и рутин), изофлавонов (биоханин А, генистеин и генистин) и флорглюцинолов (ДГАФ и ТГАФ). В отличие от биоханина А, изофлавоны даидзеин, несмотря на малое число гидроксильных групп, практически не влияют на величину дипольного потенциала ДФФХ-мембран. Поскольку константа десорбции даидзеина выше, чем биоханина А, можно предположить меньшее сродство первого к липидной фазе по сравнению со вторым. Еще одной возможной причиной наблюдаемых различий может быть разная ориентация даидзеина и биоханина А в мембране, обусловленная тем, что в молекуле даидзеина две гидроксильные группы расположены на противоположных концах молекулы, а в биоханине А – на одном. Следует также отметить, что константы десорбции гликозидов (флорицина, рутина и генистина) превышают этот параметр для соответствующих им агликонов (флоретина, кверцетина и генистеина). По всей вероятности, этот факт, как и меньшие изменения  $\phi_d$  в присутствии гликозидов по сравнению с агликонами, обусловлен большей гидрофильностью гликозидов, а следовательно, их меньшим сродством к липидной фазе. Среди проверенных флавоноидов наибольшими константами десорбции обладают флорглюцинолы, ТГАФ и ДГАФ. Последнее наблюдение хорошо согласуется с результатами [40], которые показали, что коэффициент распределения ТГАФ между лецитином и водой в 8 раз меньше, чем у флоретина.

В *табл. 2* представлены характеристические параметры изотермы адсорбции на липидных бислоях различного состава самого «сильного» из флавоноидов модификатора – флоретина. Как видно из *табл. 2*, способность флоретина уменьшать  $\varphi_a$  зависит от вида мембранообразующего липида. ДОФЭ в результате ненасыщенности и ДФФХ благодаря разветвленности углеводородных цепей имеют тенденцию к образованию неламеллярных структур, поэтому в образованных ими бислоях возникает эластическое напряжение вследствие деформации монослоев, характеризующихся отрицательной спонтанной кривизной. Это напряжение может быть обнаружено при исследовании профиля латерального давления в бислое [41, 42]. ДОФХ формирует ламеллярные структуры, и включающие его монослои спонтанной кривизны практически не имеют. Максимальное уменьшение дипольного потенциала при адсорбции флоретина практически одинаково для ДОФХ-, ДОФЭ- и ДФФХ-мембран (*табл. 1 и 2*). Эти результаты указывают на то, что плоскость адсорбции модификатора в мембране не совпадает с областью скачка латерального давления в ДОФЭ- и ДФФХ-бислоях. При этом флоретин приблизительно в 1.5 раза менее эффективен в отношении бислоев, включающих отрицательно заряженный фосфолипид ДОФС (ДОФС или ДОФС/ДОФЭ) по сравнению с мембранами, сформированными из незаряженных фосфолипидов (ДФФХ, ДОФХ или ДОФЭ). Аналогичный результат получен [43] при изучении адсорбции флоретина на нейтральных и отрицательно заряженных монослоях из димиристоилфосфатидилхолина и димиристоилфосфатидилглицерина соответственно. Учитывая, что за уменьшение дипольного потенциала ответственна незаряженная форма флоретина [1], наблюдаемые различия не могут определяться снижением сорбции заряженной формы модификатора на ДОФС-содержащих мембранах. Об этом свидетельствует и близость значений констант десорбции флоретина для незаряженных ДФФХ, ДОФХ и ДОФЭ и заряженных ДОФС-мембран (*табл. 1 и 2*). Это позволяет утверждать, что коэффициент распределения модификатора практически не зависит от фосфолипидного состава мембраны. Подобный эффект может быть следствием положительной спонтанной кривизны монослоев из ДОФС, возникающей из-за «расталкивания» одноименно заряженных липидных голов. В результате, сорбирующиеся в этой области молекулы флоретина могут приобретать ориентацию, отличную от незаряженных мембран, и/или иметь большее число возможных конформаций.

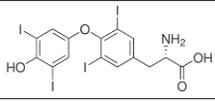
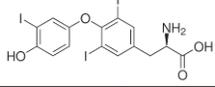
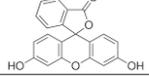
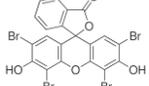
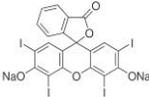
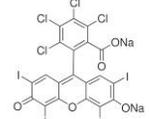
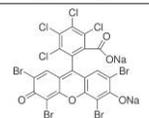
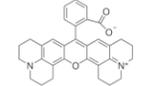
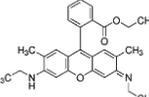
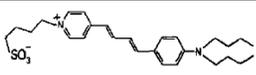
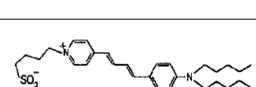
### Миорелаксанты

Как видно из *табл. 1*, добавка бромидов панкурония, векурония и рокурония в растворы, омывающие ДФФХ-мембраны, практически не влияет на их дипольный потенциал (величина  $\gamma$  составляет не более 2%). Можно заключить, что все исследуемые миорелаксанты обладают слабыми дипольмодифицирующими свойствами. Учитывая, что имеющий только одну гидроксильную группу насыщенный стероид 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ -ол увеличивает дипольный потенциал липидных бислоев [20], можно предположить, что отсутствие влияния стероидных миорелаксантов на  $\varphi_a$  связано с модификациями, увеличивающими гидрофильность стероидной молекулы (присоединение ацетатных групп и азотсодержащих гетероциклов). Высокая гидрофильность и наличие функциональных групп на разных концах молекул панкурония, векурония и рокурония позволяют думать, что сорбированные на поверхности мембраны миорелаксанты практически не погружаются в бислой. О малой глубине погружения косвенно свидетельствует и отсутствие влияния бромида панкурония на дипольный потенциал ДОФХ-мембран (величина  $\gamma$  равна  $3 \pm 1$ ), которые, в отличие от ДФФХ-бислоев, не испытывают скачка латерального давления в углеводородной области. При этом малые величины констант десорбции миорелаксантов (*табл. 1*) указывают на высокий коэффициент распределения этих соединений между бислоем и водным раствором.

Поверхностный заряд мембраны существенным образом сказывается на адсорбции стероидных миорелаксантов. Бромиды панкурония и векурония увеличивают дипольный потенциал отрицательно заряженных ДОФС/ДОФЭ-мембран (величина  $\gamma$  равна  $17 \pm 3\%$ ), при этом более гидрофобный бромид рокурония на величину  $\varphi_a$  ДОФС/ДОФЭ-бислоев практически не влияет (величина  $\gamma$  около 1%). Зависимость эффектов от заряда мембранообразующих липидов позволяет предположить, что за изменение дипольного потенциала при введении панкурония и векурония ответственны положительно заряженные формы модификаторов. Однако в ДОФС/ДОФЭ-бислоях константа десорбции этих миорелаксантов на два порядка больше, а следовательно, сродство меньше, чем в ДФФХ-мембранах, что свидетельствует об обратном. По всей вероятности, как и в случае флоретина, наблюдаемые различия обусловлены не электростатическим взаимодействием между модификаторами и ДОФС-содержащей мембраной, а положительной спонтанной кривизной монослоя. На этом основании можно думать, что в ДОФС/ДОФЭ-бислоях панкуроний и векуроний локализируются вблизи расталкивающихся отрицательно заряженных сериновых голов.

Таблица 1. Относительные изменения величины дипольного потенциала ДФФХ мембран в присутствии различных модификаторов ( $\gamma$ ) и их константы десорбции ( $K$ )

Класс	Дипольный модификатор	Химическая структура	$\gamma$ , %	$K$ , мкМ
Флавоноиды	Флоретин		$-59 \pm 12$	$2.0 \pm 0.5^*$
	Флорицин		$-37 \pm 7$	$5.1 \pm 0.2^*$
	Кверцетин		$-42 \pm 9$	$3.3 \pm 0.5^*$
	Мирицетин		$-44 \pm 12$	$3.3 \pm 0.2^*$
	Рутин		$-17 \pm 5$	$10.8 \pm 0.5$
	Биоханин А		$-37 \pm 10$	$2.1 \pm 0.3^*$
	Даидзеин		$-8 \pm 4$	$8.8 \pm 0.2$
	Генистеин		$-28 \pm 8$	$1.3 \pm 0.2^*$
	Генистин		$-2 \pm 2$	$9.6 \pm 0.5$
	Катехин		$-1 \pm 1$	$0.7 \pm 0.2$
	Таксифолин		$-3 \pm 1$	$5.8 \pm 0.6$
	ТГАФ		$-6 \pm 3$	$26.4 \pm 5.6^*$
	ДГАФ		$-20 \pm 5$	$10.2 \pm 0.4$
Миорелаксанты	Панкуроний		$2 \pm 2$	$0.1 \pm 0.1$
	Векуроний		$1 \pm 1$	$0.1 \pm 0.1$
	Рокуроний		$2 \pm 2$	$0.1 \pm 0.1$

Тиреоидные гормоны	Тироксин		$-24 \pm 7$	$3.5 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Триодтиронин		$-23 \pm 7$	$5.3 \pm 0.2^{\text{®}}$
Ксантеновые красители	Флуоресцеин		$-2 \pm 1$	$0.4 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Эозин Y		$-2 \pm 1$	$0.4 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Эритрозин		$-26 \pm 7$	$0.8 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Бенгальский розовый		$-48 \pm 11$	$0.2 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Флоксин В		$-33 \pm 7$	$0.2 \pm 0.1^{\text{®}}$
	Родамин 101		$-9 \pm 4$	$0.3 \pm 0.1$
	Родамин 6G		$-4 \pm 1$	$0.4 \pm 0.1$
Стирилпиридиновые красители	RH 160		$15 \pm 6$	–
	RH 237		$19 \pm 4$	–
	RH 421		$47 \pm 9$	–
	di-8-ANEPPS		$1 \pm 1$	–

® Результаты взяты из [44].

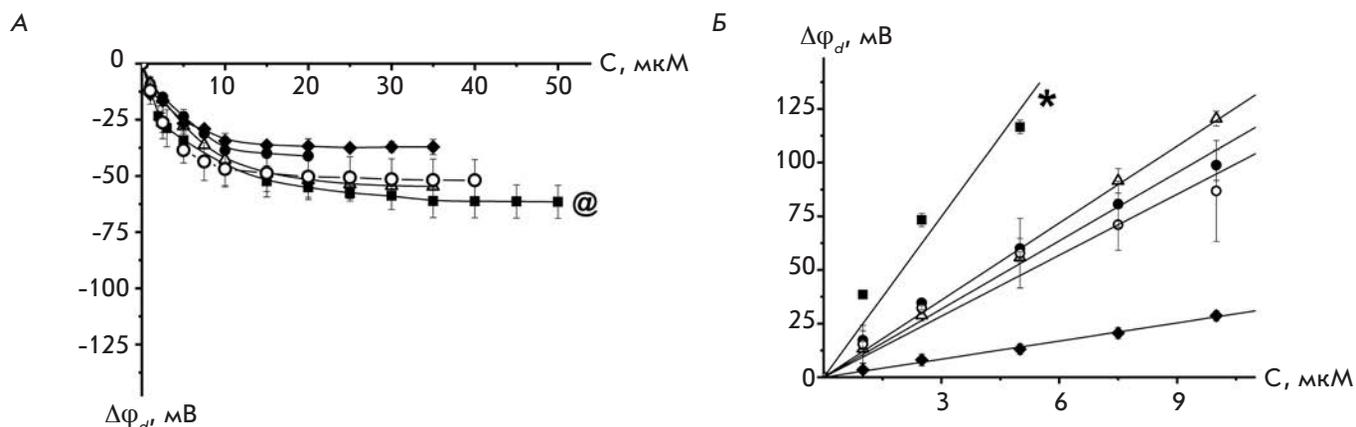
\* Результаты взяты из [46].

### Тиреоидные гормоны

Сравнение величин  $\gamma$  тиреоидных гормонов показывает, что тироксин и триодтиронин – это дипольные модификаторы «средней» эффективности, сходным образом увеличивающие дипольный потенциал ДФФХ-мембран. Аналогичные результаты были получены ранее [27]. Этот факт позволяет предположить, что присутствие в молекуле тироксина допол-

нительного (по сравнению с триодтиронином) атома йода слабо влияет на дипольный момент модификатора и его ориентацию в бислое.

На *рисунке А* показаны зависимости величин уменьшения дипольного потенциала ДФФХ-, ДОФХ-, ДОФС-, ДОФЭ- и ДОФС/ДОФЭ-бислоев от концентрации тироксина в омывающих растворах. В *табл. 2* представлены величины  $\gamma$ , характеризую-



Зависимость величины изменения дипольного потенциала мембран ( $\Delta\phi_d$ ) от концентрации тироксина (А) и RH 421 (Б) в омывающем растворе. Мембраны сформированы из ДФФХ\*<sup>®</sup> (■), ДОФХ (•), ДОФС (◆), ДОФЭ (Δ) и ДОФС/ДОФЭ (50/50 мол. %) (○) и омываются 0.1 М раствором КСl при pH 7.4.  $V = 50$  мВ. ® Результаты взяты из [44]. \*Результаты взяты из [46]

Таблица 2. Относительные изменения величины дипольного потенциала фосфолипидных бислоев в присутствии различных модификаторов ( $\gamma$ ) и их константы десорбции ( $K$ )

Дипольный модификатор	Параметр	ДОФХ	ДОФЭ	ДОФС	ДОФС/ДОФЭ (50/50 мол. %)
Флоретин	$\gamma$ , %	$-62 \pm 9$	$-58 \pm 5$	$-38 \pm 6$	$-41 \pm 8$
	$K$ , мкМ	$0.7 \pm 0.2^*$	$2.2 \pm 0.4^*$	$2.7 \pm 0.8^*$	$2.8 \pm 0.2$
Тироксин	$\gamma$ , %	$-18 \pm 5$	$-25 \pm 4$	$-16 \pm 5$	$-22 \pm 6$
	$K$ , мкМ	$3.8 \pm 0.3$	$5.9 \pm 0.5$	$2.8 \pm 0.3$	$3.4 \pm 0.2$
RH 421	$\gamma$ , %	$27 \pm 5$	$25 \pm 2$	$5 \pm 2$	$25 \pm 9$

\* Результаты взяты из [46].

щие относительные изменения дипольного потенциала мембраны при адсорбции тироксина на липидных бислоях различного состава. Из *рисунка А* и *табл. 2* видно, что эффективность тироксина мало зависит от заряда мембранообразующих липидов. Сходные результаты получены при сравнении ДФФХ- и дифитаноилфосфосериновых бислоев [44]. Отсутствие зависимости эффектов модификатора (как величин  $\gamma$ , так и значений  $K$ ) от поверхностного заряда мембраны указывает на то, что уменьшение дипольного потенциала мембран обусловлено сорбцией незаряженной формы йодсодержащих гормонов щитовидной железы. В пользу этого свидетельствуют и данные [27]. Близость значений  $\gamma$  для ДФФХ-, ДОФХ-, ДОФЭ- и ДОФС-мембран дает основание утверждать, что спонтанная кривизна монослоев не сказывается на сорбции тироксина. Можно предположить, что плоскость адсорбции модификатора

располагается между областями, соответствующими скачку латерального давления в ДОФЭ- и ДФФХ-мембранах и локализации заряженных остатков серина в ДОФС-бислоях.

### Ксантеновые красители

Из *табл. 1* видно, что рассмотренные в работе ксантеновые красители уменьшают дипольный потенциал ДФФХ-мембран. Оценка эффективности дипольмодифицирующего действия красителей позволяет отнести бенгальский розовый и флоксин В к наиболее эффективным модификаторам; эритрозин – к соединениям со «средней» эффективностью; а флуоресцеин, эозин Y, родамин 6G и родамин 101 – с «малой» эффективностью.

Сравнивая представленные в *табл. 1* структуры, можно заключить, что основными факторами, определяющими величину уменьшения дипольного

потенциала мембран при введении этих модификаторов, являются тип и локализация галогеновых заместителей в молекуле красителя. Можно думать, что выраженное уменьшение величины дипольного потенциала мембран при введении эритрозина обусловлено наличием в его молекуле атомов йода. Отсутствие последних во флуоресцеине или замена йода на бром в эозине У приводит к потере дипольмодифицирующих свойств этих соединений. Сходным образом замена йода на бром во флоксине В снижает эффективность модификатора по сравнению с эффективностью бенгальского розового. В этом случае выраженность дипольмодифицирующих свойств флоксина В следует отнести к присутствию в его структуре хлора. Присутствие как атомов йода, так и атомов хлора в молекуле бенгальского розового делает его самым эффективным дипольным модификатором среди изученных ксантовых красителей. Замена гидроксильной группы в молекуле флуоресцеина на аминогруппу в молекулах родаминов не влияет на способность модификаторов изменять величину дипольного потенциала бислоев.

Ранее мы показали, что за уменьшение дипольного потенциала мембраны ответственна анионная форма ксантового красителя [44].

Сравнивая величины  $K$  можно отметить, что ксантовые красители характеризуются на порядок большим сродством к фосфолипидным мембранам, чем флавоноиды и тиреоидные гормоны (табл. 1).

### Стирилпиридиновые красители

Согласно [28] величина увеличения дипольного потенциала ДФФХ-мембран прямо пропорциональна концентрации стирилпиридиновых красителей в омывающих растворах в диапазоне от 0 до 15 мкМ. В табл. 1 представлены величины  $\gamma$ , характеризующие относительные изменения дипольного потенциала мембраны при введении 5 мкМ красителя. Эти результаты позволяют построить ряд эффективности стирилпиридиновых красителей: di-8-ANEPPS не обладает дипольмодифицирующим действием, RH 160 и RH 237 характеризуются «средней», а RH 421 – наибольшей эффективностью в отношении дипольного потенциала ДФФХ-мембран. Полученные результаты согласуются с данными для красителей серии RH [28].

Способность увеличивать  $\phi_d$  зависит от ориентации и глубины погружения красителя в мембрану. Согласно [45] глубина погружения в ДФФХ-бислой возрастает в ряду RH 160 < RH 421 < RH 237. Минимальное среди тестируемых красителей погружение RH 160 в мембрану, по всей вероятности, обусловлено его наименьшей гидрофобностью. Наибольшая эффективность RH 421 в отношении

ДФФХ-мембран при промежуточной плоскости его адсорбции может быть связана с наиболее близкой ориентацией к нормали этого красителя в мембране [45]. RH 421 и di-8-ANEPPS должны характеризоваться близким по величине дипольным моментом, поскольку имеют пиридиновые комплексы одинаковой длины. По этой причине отсутствие влияния di-8-ANEPPS на величину дипольного потенциала ДФФХ-мембран можно связать не со структурными различиями в пиридиновом комплексе, а с большей длиной углеводородных «хвостов» по сравнению с RH 421, которые определяют погружение и ориентацию красителя в бислой.

На рисунке Б представлены зависимости величин увеличения дипольного потенциала ДФФХ-, ДОФХ-, ДОФЭ-, ДОФС- и ДОФС/ДОФЭ-бислоев от концентрации RH 421 в омывающих растворах. В табл. 2 показаны величины  $\gamma$ , характеризующие относительное увеличение дипольного потенциала мембраны при введении 5 мкМ RH 421 в околомембранные растворы. Зависимость дипольмодифицирующего действия RH 421 от вида мембранообразующего липида (ДФФХ, ДОФХ и ДОФС) может указывать на влияние профиля латерального давления на ориентацию красителя в бислой. Кроме того, RH 421 мало эффективен в отношении отрицательно заряженных мембран из ДОФС. Это может быть результатом расталкивания одноименно заряженных сульфатных групп модификатора и сериновых фрагментов. По всей вероятности, это способствует увеличению положительной спонтанной кривизны монослоя при адсорбции RH 421 и изменению ориентации дипольного момента красителя по сравнению с ДФФХ-, ДОФХ-, ДОФЭ- и ДОФС/ДОФЭ-мембранами. К подобному заключению пришли и при изучении каналообразующей активности антимикробных пептидов в присутствии RH 421 [15].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количественно охарактеризовано дипольмодифицирующее действие некоторых флавоноидов, стероидных миорелаксантов, тиреоидных гормонов, ксантовых и стирилпиридиновых красителей в отношении фосфолипидных бислоев различного состава. Выявлены структурные особенности модификаторов, ответственные за их способность изменять величину дипольного потенциала мембран. Как правило, более гидрофобные соединения обладают более выраженными дипольмодифицирующими свойствами. В случае флавоноидов значение также имеют конформация молекулы и локализация гидроксильных групп, а для ксантовых красителей – тип и локализация галогеновых заместителей. Варьирование фосфолипидного состава мембран по-

зволило предсказать плоскость адсорбции наиболее эффективных соединений в каждой группе модификаторов. Изменение профиля латерального давления в бислое влияет на адсорбцию флоретина, бромидов панкурония и векурония, а также RH 421. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 14-14-00565), РФФИ (№ 15-34-20356), программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», СП-69.2015.4 и НШ-1721.2014.4.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andersen O.S., Finkelstein A., Katz I., Cass A. // J. Gen. Physiol. 1976. V. 67. P. 749–771.
2. Franklin J.C., Cafiso D.S. // Biophys. J. 1993. V. 65. P. 289–299.
3. Cseh R., Hetzer M., Wolf K., Kraus J., Bringmann G., Benz R. // Eur. Biophys. J. 2000. V. 29. P. 172–183.
4. Wang L. // Annu. Rev. Biochim. 2012. V. 81. P. 615–635.
5. Pickar A.D., Benz R. // J. Membr. Biol. 1978. V. 44. P. 353–376.
6. Clarke R.J. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1327. P. 269–278.
7. Starke-Peterkovic T., Clarke R.J. // Eur. Biophys. J. 2009. V. 39. P. 103–110.
8. Sun X., Garlid K.D. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 19147–19154.
9. Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Antonenko Y.N. // Biophys. J. 2002. V. 82. P. 865–873.
10. Hwang T.C., Koeppe R.E., Andersen O.S. // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 13646–13658.
11. Luchian T., Mereuta L. // Langmuir. 2006. V. 22. P. 8452–8457.
12. Ostroumova O.S., Kaulin Y.A., Gurnev A.P., Schagina L.V. // Langmuir. 2007. V. 23. P. 6889–6892.
13. Asandei A., Mereuta L., Luchian T. // Biophys. Chem. 2008. V. 135. P. 32–40.
14. Mereuta L., Luchian T., Park Y., Hahn K.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 373. P. 467–472.
15. Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1790. P. 809–816.
16. Ostroumova O.S., Malev V.V., Ilin M.G., Schagina L.V. // Langmuir. 2010. V. 26. P. 15092–15097.
17. Lundbaek J.A., Koeppe R.E., Andersen O.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 15427–15430.
18. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Schagina L.V. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1808. P. 2051–2058.
19. Mereuta L., Asandei A., Luchian T. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e25276.
20. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Schagina L.V. // PLoS One. 2012a. V. 7. P. e30261.
21. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Chulkov E.G., Schagina L.V. // PLoS One. 2012b. V. 7. P. e45135.
22. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Mikhailova E.V., Schagina L.V. // Eur. Biophys. J. 2014. V. 43. P. 207–215.
23. Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. // Langmuir. 2014. V. 30. P. 7884–7892.
24. Chulkov E.G., Schagina L.V., Ostroumova O.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1848. P. 192–199.
25. Ефимова С.С., Захаров В.В., Остроумова О.С. // Цитология. 2015. Т. 57. С. 144–152.
26. Reyes J., Greco F., Motais R., Latorre R. // J. Membr. Biol. 1983. V. 72. P. 93–103.
27. Цыбульская М.В., Антоненко Ю.Н., Тропша А.Е., Ягужинский Л.С. // Биофизика. 1984. Т. 29. С. 801–805.
28. Malkov D.Y., Sokolov V.S. // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1278. P. 197–204.
29. Kotova E.A., Rokitskaya T.I., Antonenko Yu.N. // Membr. Cell Biol. 2000. V. 13. P. 411–420.
30. Issé B.A., Yunes Quartino P., Fidelio G.D., Farias R.N. // Chem. Phys. Lipids. 2013. V. 175–176. P. 131–137.
31. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A. // Mol. Cell Biochem. 2008. V. 314. P. 65–71.
32. Starke-Peterkovic T., Turner N., Vitha M.F., Waller M.P., Hibbs D.E., Clarke R.J. // Biophys. J. 2006. V. 90. P. 4060–4070.
33. Alakoskela J.M., Söderlund T., Holopainen J.M., Kinnunen P.K. // Mol. Pharmacol. 2004. V. 66. P. 161–168.
34. Montal M., Muller P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972. V. 65. P. 3561–3566.
35. Cseh R., Benz R. // Biophys. J. 1998. V. 74. P. 1399–1408.
36. Peterson U., Mannock D.A., Lewis R.N., Pohl P., McElhaney R.N., Pohl E.E. // Chem. Phys. Lipids. 2002. V. 117. P. 19–27.
37. Flewelling R.F., Hubbell W.L. // Biophys. J. 1986a. V. 49. P. 531–540.
38. Flewelling R.F., Hubbell W.L. // Biophys. J. 1986b. V. 49. P. 541–552.
39. de Levie R., Rangarajan S.K., Seelig P.F., Andersen O.S. // Biophys. J. 1979. V. 25. P. 295–300.
40. Awiszus R., Stark G. // Eur. Biophys. J. 1998. V. 15. P. 299–310.
41. Cantor R.S. // Biophys. J. 1999. V. 76. P. 2625–2639.
42. Bezrukov S.M. // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2000. V. 5. P. 237–243.
43. Lairion F., Disalvo E.A. // Langmuir. 2004. V. 20. P. 9151–9155.
44. Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. // J. Membr. Biol. 2014b. V. 247. P. 739–745.
45. Passechnik V.I., Sokolov V.S. // Bioelectrochemistry. 2002. V. 55. P. 47–51.
46. Efimova S.S., Ostroumova O.S. // Langmuir. 2012. V. 28. P. 9908–9914.